



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Unidad de Posgrado

**Localización y organización sub-celular de las
proteínas AcrAB-TolC componentes de la bomba de
eflujo en *Escherichia coli* MG1655**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Microbiología

AUTOR

Daniel Edgar VEGA MENDOZA

Lima, Perú

2012

RESUMEN



RESUMEN

Las bombas de eflujo son proteínas transportadoras asociadas con mecanismos de resistencia múltiple a drogas (MDR). Existen 5 familias MDR: **ABC**, **RND**, **MATE**, **MF** y **SMR**. Muchas investigaciones están enfocadas en el mecanismo de ensamblaje y función de los transportadores RND y específicamente de las proteínas componentes del complejo AcrAB-TolC.

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo principal la determinación del patrón de localización y organización subcelular de las proteínas componentes de este complejo en condiciones de expresión nativa o artificial. La estrategia empleada, se basa en reemplazar el codón de parada con una proteína fluorescente verde (sfGFP), lo cual permitiría una visualización “*in vivo*”. Las construcciones generadas, mostraron un patrón de localización subcelular difuso en un fondo genético silvestre. Sorprendentemente, el patrón difuso cambio a polar en un mutante deficiente en el gen *tolC*. Se verificó la estabilidad de las construcciones, determinando su apropiada funcionalidad y se descartó que se trataran de cuerpos de inclusión.

Se evaluaron genes con diferentes grados de homología a *acrAB* y que ensamblan (o no) con *tolC*, determinándose que el cambio observado en ausencia de *tolC* es específico solo para las proteínas AcrAB. Se observó además que la ausencia de *tolC* suprime la expresión y localización polar de la proteína Tar (quimorreceptor). Se determinó además que las proteínas AcrAB están asociadas o integradas a la membrana interna tanto en localización difusa como polar.

Se determinó que la ausencia de *tolC* (pero no Δ *acrAB*) afecta la movilidad, resistencia a antibióticos, capacidad de división celular con morfología aberrante (sólo en M9). Se descubrió que solo tras la adición de FeSO₄, se restauran los defectos observados en mutantes Δ *tolC*. También descubrimos una variación en el perfil de las PBPs, cuando las células aberrantes restauran su fenotipo normal. Este descubrimiento nos permitió establecer una conexión entre las proteínas componentes de la bomba de eflujo AcrAB-TolC con los procesos de división celular, movilidad, resistencia a antibióticos y morfogénesis.

SUMMARY

SUMMARY

Efflux pumps are transporter proteins associated with bacterial multidrug resistance (MDR) mechanisms. There are 5 MDR families: **ABC**, **RND**, **MATE**, **MFS** and **SMR**. Many researches are focused on the assemble mechanism and function of RND transporters and specifically on proteins component of AcrAB-TolC complex.

The present research shows a new and different approach, based on the subcellular localization and organization pattern of proteins component of this complex under native or artificial expression levels. The strategy employed is based on replacement of the stop codon with a Green Fluorescent Protein, which lets “in vivo” visualization. The genetic constructs generated showed a diffuse subcellular localization pattern in a wild type genetic background. Surprisingly, the diffuse pattern changed to polar in a genetic background lacking *tolC* gene. Stability and proper functionality of these constructs were determined and inclusion bodies formation was discarded.

Several genes sharing different homology rates with *acrAB*, able (or not) to assemble with *tolC* were evaluated to determine whether changes in absence of *tolC* gene is specific only for AcrAB. It was also observed that absence of *tolC* suppresses expression and localization of polar Tar protein (chemoreceptor). Location of AcrAB proteins was determined showing that both of them proteins are associated or integral to inner membrane in diffuse as in polar localization pattern.

It was determined that absence of *tolC* (not Δ *acrAB*) affects motility, antibiotic resistance, cell division and even morphology (mutants showed aberrant phenotype only when grown in M9 media) were affected. We discovered that only after addition of FeSO_4 , defects in Δ *tolC* mutants were restored. We also discovered a variation in PBPs profile, during recovering of normal phenotype. This discovering let us to establish a connection between the proteins component of AcrAB-TolC efflux pump with cellular division, motility, antibiotic resistance and morphogenesis processes.